

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06950

研究課題名(和文)新規インスリン分泌促進・阻害化合物の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of regulation of glucose-stimulated insulin secretion by novel small-molecule activators and inhibitors in pancreatic beta-cells

研究代表者

松永 耕一 (MATSUNAGA, Kohichi)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：20570162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン分泌をコントロールできる新規化合物同定のため、スクリーニング解析を行なったところ、新規インスリン分泌促進化合物と阻害化合物を数種類同定した。一つの新規分泌促進化合物において、細胞内でのターゲット分子を探索したところ、ミトコンドリアタンパク質であるVDACを同定した。siRNAによるノックダウンにより、VDAC1の発現を抑制した膵細胞では、化合物によるインスリン分泌増大が抑制された。さらにこの化合物は、細胞内のATP濃度をグルコース刺激依存的に通常より増大させることがわかり、VDACと結合し、細胞内のATP濃度を増大させることにより、インスリン分泌を促進させることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は我が国を含め世界中で増加の一途をたどっており、より副作用の少ない、インスリン分泌をコントロールできる新規薬剤の開発は以前重要な課題の一つです。本研究で行われた網羅的な薬剤スクリーニングにより、新規に発見されたインスリン分泌促進・阻害化合物と、それら同定された化合物の詳細な分子メカニズム解析の知見は、新しい糖尿病薬開発を行うための基盤になると考えています。

研究成果の概要(英文)：To identify novel small-molecules of insulin secretion regulator, we examined high-throughput screening analysis to identify chemical compounds that activate (or inhibit) insulin secretion in pancreatic beta-cells and identified several kinds of compounds as activator (or inhibitor) of insulin secretion. Pull-down assay experiment using chemical compound conjugated magnetic beads revealed that one of the activators binds to mitochondrial protein, VDAC. siRNA-mediated depletion of VDAC1 in INS1 832/13 cells reduced increase of insulin secretion by the activator, and in addition, intracellular ATP level is increased by the activator in beta-cells. These results demonstrate that glucose-stimulated insulin secretion is up-regulated by increase of intracellular ATP level through binding of the novel activator to VDAC protein.

研究分野：細胞生物学

キーワード：インスリン分泌 ケミカルバイオロジー 化合物ライブラリ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者数は我が国でも増加を続けており、深刻な社会問題である。糖尿病の主な原因として、 $\beta$ 細胞の破壊(I型糖尿病)、 $\beta$ 細胞機能低下によるインスリン分泌の減少、および骨格筋や脂肪でのインスリン抵抗性の増大(II型糖尿病)が挙げられる。特に日本人はインスリン分泌が欧米人よりも弱く、インスリン分泌低下による糖尿病発症が大きな要因になっている。インスリンは体内の血糖値の恒常性維持に必須なホルモンであり、体内の血糖値が上昇すると、 $\beta$ 細胞から分泌され、骨格筋や脂肪などからの糖の取り込みを促進し、血糖値を低下させる。血糖値を下げる糖尿病治療薬のうち、 $\beta$ 細胞に直接作用してインスリン分泌を促す薬剤としては、KATPチャンネルに作用して分泌を促すスルホニル尿素薬やグリニド製剤、インスリン分泌を増強する消化管ホルモンGLP-1の分泌を抑えるインクレチン関連薬(DPP-4阻害剤)等が使用されている。しかしながら前者では、深刻な低血糖状態になったり、逆に $\beta$ 細胞の疲弊や細胞死を早め、より病状を進行させるなどの副作用がある。一方、後者では吐き気、便秘などの胃腸障害の副作用が懸念される。より少ない副作用で、インスリン分泌をコントロールできる新規薬剤の開発は依然必須である。

### 2. 研究の目的

研究代表者は、独自に確立したハイスループット化合物スクリーニング解析により、4種の新規インスリン分泌促進化合物と2種類の新規インスリン分泌阻害化合物を同定し、その促進化合物の一つ、化合物Xでは、ミトコンドリア外膜に存在するチャンネルたんぱく質であるVDACと結合する事を発見した。本研究の目的は、これら新規化合物のインスリン分泌に作用する詳細な分子メカニズムを解析し、新規糖尿病治療薬開発への可能性を探ることである。

### 3. 研究の方法

#### 3-1 プルダウン法による、新規分泌促進・阻害化合物のターゲット分子の同定

最初に同定された化合物群の中で、特に分泌促進化合物二種類について解析を続けた(No. 76化合物、No. 460化合物と呼称)。まず分泌促進の分子メカニズムを調べるため、特異的に結合する分子の探索を行った。一般的に薬理作用のある化合物は、ターゲットが機能タンパク質であるので、まずターゲットとなるタンパク質の探索を行った。No. 76化合物の末端構造にアルキン基を付与したものを用意し、アジド基が表面に修飾された磁気ビーズとクリックケミストリーを利用した反応によって共有結合させ、No. 76化合物ビーズを作成した。この化合物ビーズとラット $\beta$ 細胞株INS1 832/13細胞の抽出液を混合するプルダウンアッセイ法により、 $\beta$ 細胞内でNo. 76化合物と結合するタンパク質の探索を行った。特異的に結合してきたタンパク質は、SDS-PAGEにより分離し、高感度タンパク質染色液にて検出した。検出されたバンドは質量分析によるタンパク質同定を行った。No. 460化合物についても、化合物ビーズを作成し、特異的に結合タンパク質の探索を行っており、これまでにいくつかの候補タンパク質を同定している。

#### 3-2 siRNAトランスフェクションによる、ターゲットタンパク質のノックダウン解析

3-1にて同定されたタンパク質と化合物との結合が、分泌活性に関わるのかどうかを調べた。ターゲットタンパク質に対するsiRNAを、トランスフェクションによりINS1 832/13細胞に導入した。72時間後、No. 76化合物を添加・非添加時における、グルコース刺激による分泌活性を調べた。

#### 3-3 細胞内ATP活性の測定

膵 $\beta$ 細胞は、グルコースを細胞内に取り込み、ミトコンドリア内で代謝してATPを産生し、これを感知するKATPチャンネルの閉鎖を介して、脱分極を引き起こす。その結果、電位依存性のCa<sup>2+</sup>チャンネルが解放され、細胞内に流入するCa<sup>2+</sup>上昇が、分泌顆粒の開口放出(分泌)を促す。高グルコース刺激時の $\beta$ 細胞内サイトゾルATP濃度上昇が、No. 76化合物添加により変化するかどうかを調べた。No. 76化合物添加・未添加のINS1 832/13細胞に、高グルコース刺激の後、細胞を回収、ホモジネートし、100000×Gの超遠心分離により細胞質画分を得た。これにルシフェラーゼの生物発光作用を利用したATP測定キットを用い、ATP定量を行った。

#### 3-4 Hispidulinの作用機序解析

Hispidulinは、キク科の植物に含まれるフラボン類の一つで、これまでに抗酸化作用や抗炎症作用、抗腫瘍作用などの機能性が報告されている。パキスタンの研究チームとの共同研究により、Hispidulinが膵 $\beta$ 細胞に作用し、インスリン分泌に関係していることを見出した。そこ

で我々が有している化合物に結合するタンパク質を探索する手法（3-1参照）を用いて、膵β細胞内でHispidulinと特異的に結合しているたんぱく質分子の探索を行なった。エポキシ基を表面を持った磁気ビーズに、Hispidulinに存在するヒドロキシル基を利用して共有結合させ、Hispidulinビーズを作成した。そのビーズにIns1 832/13細胞の抽出液を添加することによるプルダウン実験を行った。結合してきたタンパク質群は、SDS-PAGEと高感度タンパク質染色により検出した。検出されたタンパク質バンドを切り取り、質量分析装置によるタンパク質同定を行った。

#### 4. 研究成果

4-1 No. 76化合物はVDACタンパク質と結合する。

3-1によって行われたプルダウン法により検出されたバンドは、それぞれ質量分析装置を用いたタンパク質同定が試みられた。すると、同定されたタンパク質群のうち、多くはミトコンドリア由来であることがわかり、それらは大きないくつかの複合体の成分であることがわかった。それらのうち、最も強いバンドとして検出され、薬剤が作用する可能性の高い外膜に存在する、VDACタンパク質に着目した。No. 76化合物ビーズによるプルダウン実験のサンプルに対して、抗VDAC1/2/3抗体によるウエスタンブロット解析を行い、確かに結合することが確認できた（図1）。No. 460化合物については、いくつかの候補タンパク質が同定されているので、これらを現在特異抗体によるウエスタンブロットにより確認中である。

4-2 No. 76化合物はVDACタンパク質と結合し、インスリン分泌を促進する。

次にこの結合が分泌活性に関わるのかどうかを調べた。VDACには1から3までのアイソフォームが存在するが、最も豊富に存在するVDAC1を、siRNAのトランスフェクションによりノックダウンしたINS1 832/13細胞では、No. 76化合物を添加したときでもグルコース依存性のインスリン分泌増強の効果が見られなかった。この知見から、No. 76化合物のターゲットがVDACであることが強く示唆された（図2）。

4-3 No. 76化合物は細胞内ATPを増大させる。

膵β細胞は、グルコースをミトコンドリア内で代謝してATPを産生し、KATPチャンネルがこれを感じ、チャンネルの閉鎖を介して、脱分極を引き起こし、結果として分泌顆粒の開口放出を引き起こす。この時VDACはミトコンドリア内で産生されたATPをサイトゾルへ放出する役割のあることが知られている。このことから、No. 76化合物がVDACと結合する知見と合わせて、ミトコンドリアがNo. 76化合物の作用部位であることが予想され、No. 76化合物がミトコンドリアから放出されるサイトゾルATP濃度上昇を増強させ、その結果インスリン分泌を増加させるという可能性が考えられた。そこで3-3の実験により、ATP定量を行ったところ、有意にNo. 76化合物添加時のサイトゾルATP濃度が増加することがわかった。また、群馬大学未来先端研究機構高稲正勝助教との共同研究により、ATPセンサーQUEENを用いた、細胞内ATP濃度上昇をリアルタイムでモニターするシステムを構築し、細胞内でATP濃度上昇が、No. 76化合物添加時に増加するかどうかの観察を行なっている。

タンパク質を対象とした細胞生物学的、生化学的解析では、発現量はどの程度か、どのよう

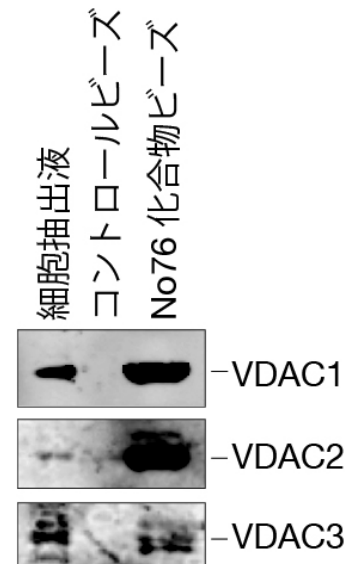


図1：No76化合物ビーズとVDACタンパク質との結合

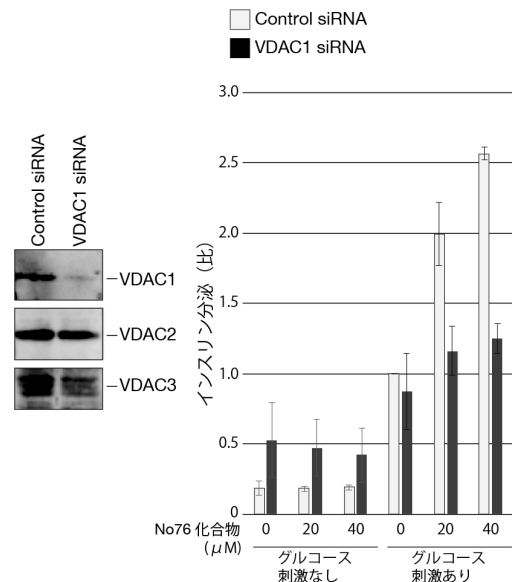


図2：VDAC1ノックダウンによる、No76化合物の分泌促進効果への影響

な複合体を形成しているか、酵素活性はあるのか等を調べていくのが定石である。そしてこれら定石の中で最も重要な知見の一つが、細胞内局在であり、特定のオルガネラにのみ存在するのかもしれないのか、するとすればさらに内部に存在するのか、外部に接しているのか、特定の刺激でこの局在は変わるのかなど、機能を推定するのにとても強力な知見を与えてくれる。しかしながら、ケミカルバイオロジーの分野では、様々な検討がされてはいるが、未だ化合物のような低分子の物質の、細胞内での局在や挙動を調べているものは非常に少ないのが現状である。我々はNo. 76化合物がミトコンドリアに局在しているのかどうかを検証するために、大阪大学工学部藤田克昌教授との共同研究により、ラマン分光顕微鏡により細胞内のアルキン基をモニターできるというシステムを応用し、先程化合物ビーズ作成に用いたアルキン化No. 76化合物の細胞内局在を、生細胞にてリアルタイムに追跡するという試みを行った。しかしながらラマンスペクトルのシグナルが非常に弱いことが明らかになり、アルキン化No. 76化合物の局在は確認できなかった。これについては、さらに検出感度を上げるための顕微鏡システムの改良や、化合物については、複数のアルキン基を用いてシグナルを増強するという試みを行なっている。

4-4 Hispidulinは膵β細胞内でAKAPタンパク質と結合する。

Hispidulinと特異的に結合するタンパク質を同定するため、3-4の実験を行い、質量分析装置によるタンパク質同定を行った。幾つかの結合タンパク質候補が同定された中で、PKAを特定のオルガネラ等に繫留するタンパク質である、A-kinase anchoring protein; AKAPファミリーの一つに着目した(AKAP-Xと呼称)。AKAPは細胞の特定の場所に局在し、その近傍にあるターゲットタンパク質を、AKAPに繫留されたPKAでリン酸化するという、PKAを特定の部位で機能させるのに必要なタンパク質であり、いくつかのアイソフォームは、インスリン分泌にも機能していることが報告されている。Hispidulinビーズによるプルダウン実験の後、AKAP-X特異的な抗体を用いたウェスタンブロットによっても、これらの結合が確認できた。このことからHispidulinがAKAP-Xに作用し、その結果インスリン分泌に影響している可能性を考え、より詳細な分子メカニズム解明を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hameed A., Hafizur RM., Khan MI., Jawed A., Wang H., Zhao M., Matsunaga K., Izumi T., Siddiqui S., Khan F., Adhikari A., Sharma KR.	4. 巻 858
2. 論文標題 Coixol amplifies glucose-stimulated insulin secretion via cAMP mediated signaling pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 172514-172525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2019.172514.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 松永耕一
2. 発表標題 メンブレントラフィックによる細胞内物流システムの分子機構
3. 学会等名 防衛大学校 GSコロキウム「感染症と安全保障 PartIV」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松永耕一、牛込剛史、近藤恭光、本田香織、長田裕之、泉 哲郎
2. 発表標題 新規インスリン分泌促進化合物の分子機構の解明
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Abdul Hameed, Rahman M Hafizur, M Israr Khan, Hao Wang, Miaomiao Zhao, Kohichi Matsunaga, Tetsuro Izumi, Sonia Siddiqui, Faisal Khan, Achyut Adhikari, and Khaga Raj Sharma.
2. 発表標題 Coixol amplifies glucose stimulated insulin secretion through cAMP-PKA signaling cascade-independent of K-ATP Channels.
3. 学会等名 The 11th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rahman M Hafizur, M Israr Khan, Abdul Hameed, Kiran Maryam, Huma Aslam Bhatti, Munneb Ali, Zaheer-UI, Faisal Khan, Ghulam Abbas, Hao Wang, Kohichi Matsunaga, and Tetsuro Izumi.
2. 発表標題 Hymecromone potentiates glucose-stimulated insulin secretion through cAMP-PKA signaling pathway.
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rahman M Hafizur, Abdul Hameed, M Israr Khan, Kiran Maryam, Muneeb Ali, Za-heer UI-Haq, Hao Wang, Miaomiao Zhao, Kohichi Matsunaga, Tetsuro Izumi, Achyut Adhi-kari, Huma Aslam Bhatti.
2. 発表標題 Exploring the insulin secretory mechanisms of hymecromone and eupatorin in mice islets.
3. 学会等名 The 7th International Symposium-cum-Training Course on Molecular Medicine and Drug Research, Karachi, Pakistan (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
パキスタン	University of Karachi		